

LUIZ FELIPE MOSCALESKI CAVAZZANI

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA
TcZFP4 CONTENDO DOMÍNIO CCCH DE INTERAÇÃO COM ZINCO, NO
PROTOZOÁRIO *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS,1909).**

Monografia apresentada à disciplina Estágio II
como requisito parcial à obtenção do grau de
bacharel em Ciências Biológicas, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Dorly de Freitas Buchi
Co-orientadora: Msc Patricia A. Mörking

CURITIBA

2005

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar forças em todos os momentos de angústia.

Ao meu Pai, minha Mãe, meu irmão e sua mulher, por serem os únicos a me compreenderem.

A minha namorada... poucas são as páginas para expressar o meu profundo e sincero agradecimento.

As minhas duas orientadoras, Patrícia por toda a sua dedicação e ensinamentos neste período em que passamos juntos e Dorly, por seus ensinamentos, pelas oportunidades criadas e por me ajudar a crescer.

Ao chefe Stenio por me ensinar a humildade que uma pessoa deve ter e por acreditar em meu potencial.

Agradeço a toda diretoria do Instituto de Biologia Molecular do Paraná, pelo total amparo durante o desenvolvimento desta monografia, bem como a equipe técnica pois sem eles este trabalho seria impossível.

Ao pessoal do laboratório 2 que proporcionam momentos de alegria e motivação.

A todos os colegas do IBMP pela convivência agradável.

Ao pessoal do Laboratório de estudos em células neoplásicas e inflamatórias por todos os bons momentos que estivemos juntos.

Aos meus amigos de graduação: Bárbara, Diogo, Ricardo, Aline, Ariani, Tomaz, Kely, Cleverson, Cristiano, Juliano.... pelo amparo nas infinitas horas de decepção, dificuldades e pelos momentos felizes criados juntos.

Aos mestres e em especial a secretária Rô e a toda Universidade Federal do Paraná por me proporcionarem o melhor ensino em Ciências Biológicas do país.

Enfim, a todos que estiveram ao meu lado durante toda a trajetória.

“Pintou estrelas no muro e teve o céu ao alcance das mãos”
Elena Kolody

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	VII
RESUMO	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. DOENÇA DE CHAGAS	2
1.2. <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	3
1.2.1. CICLO BIOLÓGICO	3
1.2.2. METACICLOGÊNESE <i>IN VITRO</i>	5
1.2.3. PECULIARIDADES DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS	6
1.2.4. TRANSCRIÇÃO POLICISTRÔNICA	6
1.2.5. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA, RNAs POLIMERASES E PROMOTORES	8
1.2.6. PROTEÍNAS COM MOTIVO ZINC FINGER	9
2. OBJETIVO GERAL	12
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. MATERIAIS	13
3.1.1. REAGENTES	13
3.1.2. TAMPÕES E SOLUÇÕES	14
3.1.3. MICRORGANISMOS	15
3.1.4. MEIOS DE CULTURA	15
3.2. MÉTODOS	16
3.2.1. AMPLIFICAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA TcZFP4 EM <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	16
3.2.2. DIGESTÃO DO PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO PQE-30 COM <i>BAMHI</i> E <i>HINDIII</i>	16
3.2.3. CLONAGEM DO PRODUTO DE PCR NO VETOR DE EXPRESSÃO PQE30 (QIAGEN®)	17
3.2.4. TRANSFORMAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> QUIMICAMENTE COMPETENTE (CEPA TOP 10F')	17
3.2.5. TÉCNICA DE PALITAGEM PARA SELEÇÃO DE CLONES POSITIVOS (TOOTHPICK)	18
3.2.6. SEQÜENCIAMENTO DO GENE <i>TcZFP4</i>	19
3.2.7. TRANSFORMAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> QUIMICAMENTE COMPETENTE (CEPA M15)	19
3.2.8. EXPRESSÃO DO GENE <i>TcZFP4</i> EM PQE30 POR INDUÇÃO COM IPTG	20
3.2.9. TESTE DA SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE TcZFP4 EXPRESSA EM <i>E. COLI</i>	20
3.2.10. OBTENÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA TcZFP4 + GST	21
3.2.11. ENSAIO DO TIPO WESTERN BLOT	21
3.2.12. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA ATRAVÉS DE GEL PREPARATIVO DE POLIACRILAMIDA	22
3.2.13. OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA TcZFP4	22

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>TcZFP4</i>	25
4.2. SEQÜENCIAMENTO DO GENE <i>TcZFP4</i>	26
4.3. EXPRESSÃO DA <i>TcZFP4</i> RECOMBINANTE EM <i>E. coli</i>	27
4.4. TESTE DA SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE <i>TcZFP4</i> EXPRESSA EM <i>E. coli</i>	29
4.5. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA <i>TcZFP4</i> UTILIZANDO A TÉCNICA DE GEL PREPARATIVO	30
4.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA <i>TcZFP4</i> POR WESTERN BLOT	31
4.7. OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA <i>TcZFP4</i>	32
4.8. OBTENÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA <i>TcZFP4</i> + GST	32
5. CONCLUSÃO	34
6. REFERÊNCIAS	35

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICO 1	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TcZFP4.....	26
FIGURA 1	ÁREAS GEOEPIDEMIOLÓGICAS DE MANIFESTAÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	1
FIGURA 2	TRIATOMÍNIO APÓS REPASTO SANGUÍNEO.....	2
FIGURA 3	CICLO DE VIDA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
FIGURA 4	TRANS-SPLICING.....	8
FIGURA 5	AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>TcZFP4</i> POR PCR.....	25
FIGURA 6	SEQÜÊNCIA DE AMONIÁCIDOS DA TcZFP4	27
FIGURA 7	EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TcZFP4 (24 kDa).....	28
FIGURA 8	TESTE DE SOLUBILIDADE.....	29
FIGURA 9	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE TcZFP4.....	30
FIGURA 10	WESTERN BLOT PARA VERIFICAR EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TcZFP4.....	31
FIGURA 11	TOOTHPICK DA LIGAÇÃO DO GENE <i>TcZPF4</i> EM VETOR DE EXPRESSÃO pGEXB.....	33

RESUMO

A tripanosomíase americana ou doença de Chagas afeta cerca 18 milhões de pessoas, em cerca de 20 países. Essa enfermidade é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, um organismo que ocupa a região basal na escala evolutiva dos eucariotos. Esse protozoário é de grande interesse biológico, pois além de ser a uma causa de morbidade, ele possui capacidade de diferenciação reversível. A regulação da expressão gênica ocorre pós-transcricionalmente e fatores relacionados a essa regulação ainda são pouco conhecidos. Nesse trabalho buscou-se caracterizar uma proteína com motivo CCCH de interação com o íon zinco, chamada TcZFP4, que por possuir esse motivo, pode estar relacionada na ligação com RNAs, podendo assim participar no controle da expressão gênica. Através de técnicas de Biologia Molecular foi possível identificar que a região codificante do gene *TcZFP4* contém 654 nucleotídeos, codificando uma proteína de 24 kDa. Observou-se que essa proteína além de conter o motivo CCCH, também possui um domínio rico em resíduos dos aminoácidos Lisina/Glutamina, que pode estar relacionado à ligação da mesma a outras proteínas para a formação de dímeros funcionais. A purificação da proteína foi possível apenas em sua forma desnaturada. Não foi possível sua expressão na forma solúvel quando clonada no plasmídeo de expressão pQE30. Outras técnicas deverão ainda ser utilizadas para tentar se obter a proteína solúvel e anticorpos policlonais contra essa proteína. Sendo a TcZFP4 específica de *T. cruzi* o conhecimento da sua função é de grande relevância para a obtenção de um alvo para o combate da enfermidade causada por esse protozoário, além de um melhor conhecimento sobre fatores de diferenciação em tripanossomatídeos.

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma importante causa de morbidade e mortalidade em 21 países do continente americano (Figura 1) e tem como origem a interação do homem com o agente etiológico *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). Estima-se que 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas com este organismo e que ocorram cerca de 50 mil mortes a cada ano nos países da América em que a doença existe (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Um aumento de casos desta doença foi detectado no final do século XIX, chegando a um pico na primeira metade do século XX (PRATA, 2001).

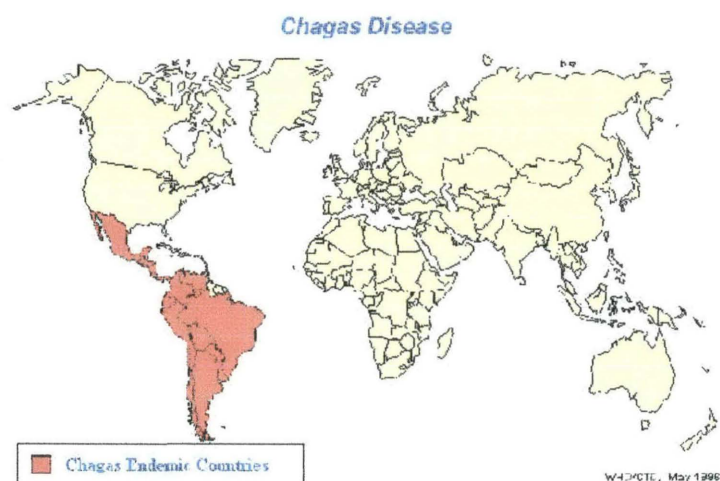


FIGURA 1 - ÁREAS GEOEPIDEMIOLOGICAS DE MANIFESTAÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS. FONTE: WHO/CTC, disponível em De SOUZA, 2002.

A transmissão natural do *T. cruzi* para humanos é associada com a picada de insetos da família Reduviidae, como o *Triatoma infestans* (principal vetor – Figura 2), *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* infectados (De SOUZA, 2002). Durante o repasto do inseto, este deposita suas excretas contendo a forma infectiva (tripomastigota metacíclico) do *T. cruzi* contaminando o local da picada (TANOWITZ et al., 1992). Como estes insetos estão presentes em regiões não urbanas, a doença atinge principalmente pessoas que vivem em áreas rurais. Entretanto, a transmissão também pode se dar por meio de transfusão de sangue e seus derivados, transplante de órgãos, via congênita, por meio de infecção acidental em laboratório e

também por via oral, com a ingestão de alimentos contaminados com a forma infectante (PRATA, 2001; MILEI et al., 1992).

No Brasil recentemente foram encontrados casos de infecção através de alimentos contaminados. Em Navegantes (SC), foram confirmados 24 casos de Doença de Chagas Aguda, onde desses, 22 ingeriram caldo de cana possivelmente contaminado (AGÊNCIA SAÚDE, 2005).



FIGURA 2 – TRIATOMÍNIO APÓS REPASTO SANGUÍNEO. FONTE: De SOUZA, 2002.

1.1. DOENÇA DE CHAGAS

Classicamente a doença de Chagas é caracterizada por duas fases: crônica e aguda. A fase aguda da doença ocorre logo após a infecção pelo parasita e é caracterizada por um conjunto de manifestações de intensidade variável. Um dos primeiros sinais é uma lesão inflamatória no local de entrada do parasita, conhecida como chagoma. Esse processo inflamatório se alastra regionalmente e uma linfadenopatia focal torna-se evidente. Quando isso ocorre na região próxima aos olhos pode formar um edema periorbital unilateral indolor (sinal de Romaña). Entretanto crianças, e com menos frequência adultos, podem desenvolver sintomas mais severos após um período de incubação de 7 a 14 dias. Esses sintomas podem ser febre, hepatoesplenomegalia, náuseas, vômitos, diarreia, coceira, anorexia e irritação na meninge (TANOWITZ et al., 1992).

Um pequeno número de pacientes com doença de Chagas na fase aguda desenvolve severa miocardia (DIAS e COURA, 1997). A alta parasitemia observada na fase aguda tende a decrescer como resultado da resposta imune do hospedeiro, tornando-se pequena na fase crônica da infecção (BRENER, 1973).

Quando os indivíduos não são tratados, estes podem evoluir para a forma crônica, e em cerca de 50% dos casos permanecem assintomáticos ou podem desenvolver, após 10 a 30 anos, lesões cardíacas (miocardite chagásica crônica), lesões no sistema digestivo (megacólon ou megaesôfago) ou neurológica em menor frequência (ANDRADE, 1985).

A Organização Mundial da Saúde estima que o número de casos com complicações crônicas esteja entre 2 a 3 milhões (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). DIAS, 1989, observou que, anualmente, 2 a 5% dos indivíduos infectados podem evoluir para a forma crônica sintomática a partir de uma fase de transição. Existe ainda nesta fase a ocorrência de pacientes infectados que sofrem o chamado fenômeno “morte súbita”, embora isso seja raro. Infelizmente não existem diagnósticos bem estabelecidos que permitam identificar os pacientes susceptíveis (RASSI, RASSI e LITTLE, 2000). Por outro lado, no que diz respeito aos diagnósticos clínicos, além dos métodos clássicos de determinação baseada na resposta imune do paciente, já se pode contar com uma tecnologia muito mais moderna e precisa que se fundamente na identificação imunológica de duas proteínas antigênicas denominadas CRA (antígeno repetitivo citoplasmático) e FRA (antígeno repetitivo flagelar) que oferece a grande vantagem de minimizar a possibilidade de diagnósticos errôneos que podem ser causados pela reação cruzada com antígenos comuns a outras doenças parasitárias (KRIEGER et al., 1992).

1.2. *Trypanosoma cruzi*

1.2.1. Ciclo biológico

O *Trypanosoma cruzi* é uma espécie de protozoário unicelular da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Este protozoário encontra ambientes de naturezas distintas durante o seu ciclo de vida, a começar pela existência de dois hospedeiros: um vertebrado mamífero e o inseto vetor (Figura 3).

O processo de diferenciação dos epimastigotas (formas proliferativas vivendo no intestino do barbeiro) em tripomastigotas metacíclicos (forma infectante do hospedeiro mamífero, que não apresenta capacidade de divisão) é um passo crucial

no ciclo de vida deste protozoário. Quando os epimastigotas alcançam a porção terminal do intestino do inseto, estes são submetidos a diferentes tipos de estresse (estresse nutricional e ácido) (CONTRERAS et al., 1985a), que vão induzir os parasitas epimastigotas a se diferenciar em formas metacíclicas.

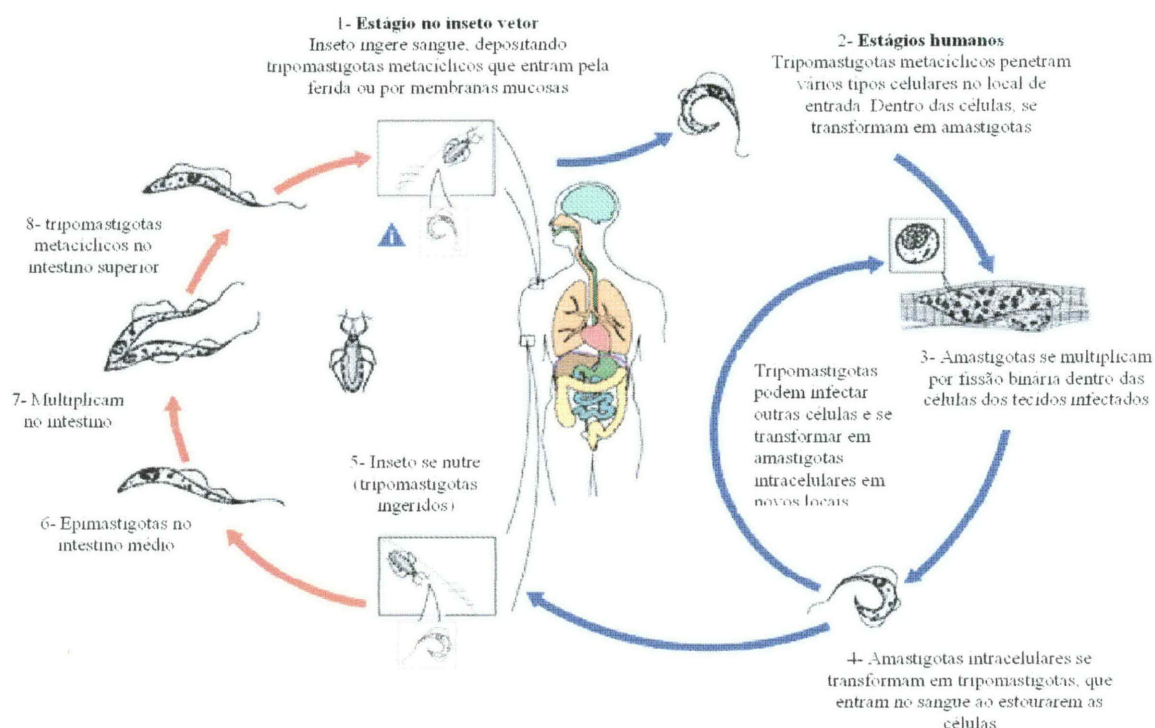


FIGURA 3 - CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*. Fonte: modificado de CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION

Assim, o parasita é transmitido durante a alimentação do vetor no hospedeiro vertebrado, quando parasitas da forma tripomastigotas metacíclicos são liberados com as fezes e urina do inseto, alcançando a corrente sanguínea do hospedeiro mamífero através de mucosas ou feridas na pele (DIAS, 1987).

A partir da circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas invadem diferentes tipos celulares e se transformam em amastigotas, que são as formas replicativas intracelulares. Após vários ciclos de multiplicação, as formas amastigotas se rediferenciam em tripomastigotas, que são liberadas na circulação sanguínea em consequência do rompimento das células infectadas. Esses tripomastigotas sanguíneos podem então infectar novas células ou alternativamente, infectar o hospedeiro invertebrado durante o seu repasto sanguíneo (BRENER, 1979).

Na porção anterior do tubo digestivo do inseto ocorre então a diferenciação dos tripomastigotas em epimastigotas. Os epimastigotas multiplicam-se durante a passagem pelo intestino médio do barbeiro e atingem o intestino posterior onde preferencialmente ocorre um processo conhecido como metaciclogênese, que é a diferenciação dos epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (ZELEDON, BOLANOS e ROJAS, 1984).

1.2.2. Metaciclogênese *in vitro*

A metaciclogênese também pode ser induzida *in vitro* utilizando condições de cultivo quimicamente definidas pela passagem do parasita de um meio rico em nutrientes para um meio simples, quimicamente definido (CONTRERAS, MOREL e GOLDENBERG, 1985(a); BONALDO et al., 1988). O meio reduzido em nutrientes (meio simples) mimetiza a urina do inseto vetor. Essa mudança drástica dispara a diferenciação do parasita (GOLDENBERG et al., 1987). A diferenciação em tripomastigotas é precedida pela adesão dos parasitas ao substrato (BONALDO et al., 1988), de modo semelhante ao que ocorre no hospedeiro invertebrado (ZELEDON et al., 1984; BÖKER e SCAUB, 1984). Neste processo observam-se mudanças no perfil dos ácidos graxos (ESTEVES et al., 1989), carboidratos (ANDRADE et al., 1991), antígenos de superfície e no perfil de expressão gênica do parasita (CONTRERAS, MOREL e GOLDENBERG, 1985(a); CONTRERAS et al., 1985(b)).

A alternância de tipos funcionais e morfolologicamente distintos durante o ciclo de vida do parasita, sugere que diferentes genes sejam expressos nos vários estágios de diferenciação. Genes com padrão de expressão estágio-específico estão certamente relacionados com propriedades biológicas características de cada estágio. Outros genes devem ser especificamente expressos nas formas replicativas do parasita. Adicionalmente, genes podem ter uma expressão transitória específica para responder às alterações de micro-ambiente que o parasita enfrenta durante a alternância de hospedeiros.

1.2.3. Peculiaridades dos tripanossomatídeos

Da mesma forma que ocorre em outros eucariontes, o *T. cruzi* possui dois genomas distintos, situados em dois compartimentos celulares bem definidos: o núcleo e a mitocôndria. Nos tripanossomatídeos, a mitocôndria é única e apresenta características peculiares, contendo uma complexa rede de moléculas circulares de DNA denominada de cinetoplasto. O DNA do cinetoplasto, ou kDNA, é composto por dois tipos de moléculas circulares que diferem em tamanho e função, os minicírculos e os maxicírculos. Os minicírculos codificam RNAs guias que estão envolvidos no processo de edição dos mRNAs das enzimas mitocondriais. Já os maxicírculos são estruturas análogas ao DNA mitocondrial dos demais eucariotos, contendo assim genes que codificam proteínas mitocondriais e RNAs ribossomais (KLINGBEIL et al., 2001).

O genoma nuclear do *T. cruzi* tem como característica a ocorrência de genes não interrompidos por “introns” (seqüência não codificadora). Há uma grande variedade de seqüências repetidas e a quantidade de DNA pode variar entre diferentes cepas do parasita, demonstrando assim ser um genoma com grande plasticidade (CLAYTON, 2002).

A organização da cromatina nos tripanossomatídeos difere em vários aspectos daquela encontrada nos eucariotos superiores e mesmo em outros protistas. Os cromossomos não se condensam durante a divisão celular e a sua segregação para as células filhas ocorre intranuclearmente, sem a dissolução do envoltório nuclear ou membrana nuclear (endomitose). Assim a visualização dos cromossomos separados só é possível por meio de eletroforese em campo pulsado (PFGE), observando-se um número diferente de cromossomos em isolados distintos (AYMERICH e GOLDENBERG, 1989). É muito provável a existência de poliploidia e/ou aneuploidia em *T. cruzi*.

Todas estas características fazem dos tripanossomatídeos um modelo de estudo altamente relevante no que diz respeito à compreensão de mecanismos celulares e moleculares pouco compreendidos atualmente.

1.2.4. Transcrição Policistrônica

O arranjo dos genes em tripanossomatídeos, e em outros organismos relacionados pertencente à ordem Kinetoplastida, é similar àquele encontrado nos operons de bactérias, onde se tem regiões codificantes de proteínas quase nunca interrompidas por íntrons (CLAYTON, 2002), embora já existam exceções descritas a essa regra, como é o caso do gene codificador da enzima Poli (A) polimerase (MAIR et al., 2000).

Entretanto a correlação estabelecida entre o operon bacteriano e o arranjo em *tandem* (seqüências repetidas) dos genes dos tripanossomatídeos desaparece quando uma análise mais minuciosa é feita. Ao contrário do operon bacteriano, os genes de tripanossomatídeos agrupados em uma orientação comum não apresentam o mesmo padrão de regulação. Os resultados de muitos experimentos sugerem que genes que possuem uma orientação comum são co-transcritos. Os mRNAs maduros são produzidos a partir de um precursor comum, chamado transcrito primário, por meio do mecanismo de “trans-splicing” (ULLU, MATTHEWS e TSCHUDI, 1993; MATTHEWS, TSCHUDI e ULLU, 1994).

O trans-splicing é uma reação intermolecular da qual participa uma espécie doadora (RNA da seqüência líder ou SL) e um aceptor, que é o mRNA que está sendo sintetizado. A reação envolve a clivagem das duas espécies de RNAs e a transferência da SL para o mRNA (Figura 4).

A SL é derivada de um RNA de 110 nucleotídeos codificado por genes localizados em um ou dois cromossomos, dependendo da cepa de *T. cruzi*. O RNA da SL é clivado e uma seqüência de 39 nucleotídeos resultante desta reação é transferida para a extremidade 5' não traduzida do mRNA nascente. Como resultado, cada mRNA maduro apresenta uma seqüência comum na extremidade 5' não traduzida (CAP).

Esta SL está presente em todos os mRNAs do tripanossoma. Sua função exata não é conhecida, mas existem evidências de que ela confere estabilidade ao mRNA, impedindo a sua degradação, auxiliando também a interação do mRNA com o ribossomo.

Outra etapa que ocorre durante a transcrição do mRNA é a adição de uma cauda rica em adenosina (cauda poli(A)) na extremidade 3' não traduzida. A cauda poli(A) é composta por cerca de 50 nucleotídeos adenosina que são incorporados ao

mRNA por meio da enzima poli A polimerase. A cauda poli(A) também está relacionada à estabilização da molécula de mRNA.

O mecanismo de trans-splicing é essencial para o processo de expressão gênica dos tripanossomatídeos, e tem sido um dos mecanismos moleculares mais intensamente estudados nestes organismos.

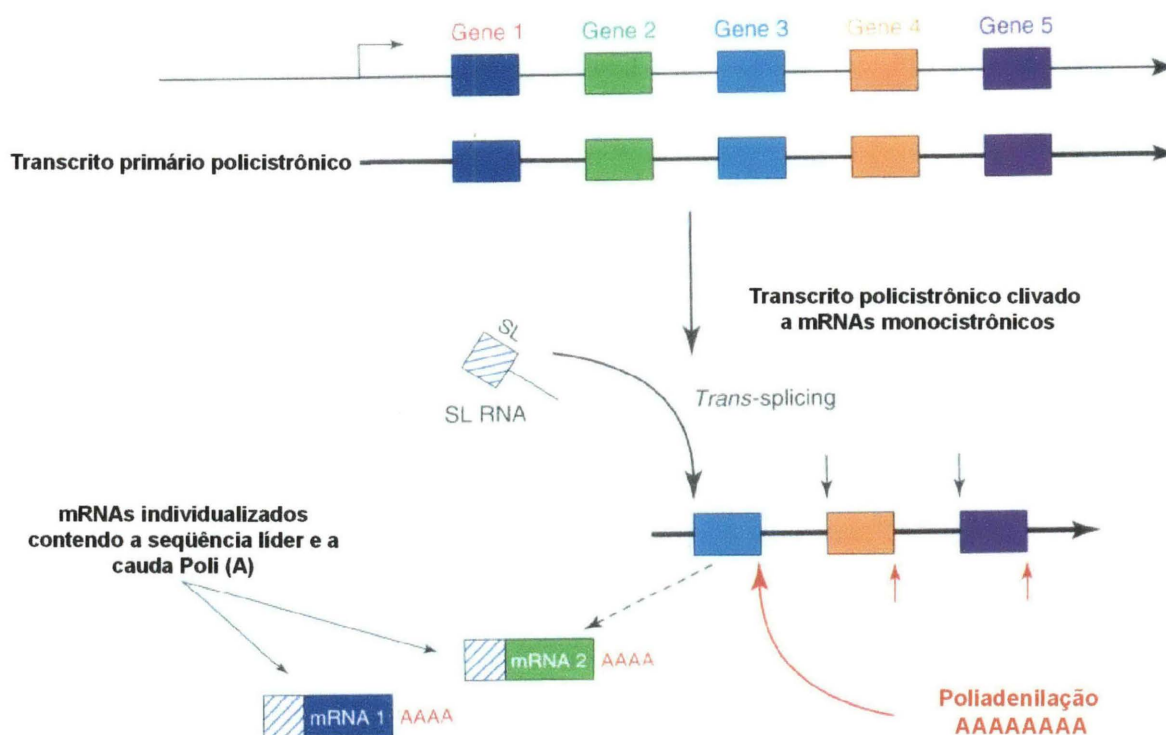


FIGURA 4 – TRANS-SPLICING. Fonte: modificado de CAMPBELL, STURM e YU, 2000.

1.2.5. Regulação da expressão gênica, RNAs polimerases e promotores

Muitos esforços têm sido despendidos na procura por promotores da transcrição em tripanossomatídeos. O primeiro promotor identificado foi do gene que codifica o promotor reconhecido pela RNA polimerase I em *T. brucei* (LAUFER et al., 1999; LAUFER E GÜNZL, 2001), com estrutura semelhante à de outros promotores eucarióticos de rRNA.

Embora os três tipos de RNAs polimerases (RNA polimerase I, II e III) descritas nos eucariontes superiores, com base na sensibilidade aos inibidores α -amanitina e tagetitoxina, tenham sido encontrados nos tripanossomatídeos, a sensibilidade observada não obedece rigorosamente aos mesmos critérios da

classificação pertinente aos eucariotos, no que diz respeito à sensibilidade a α -amanitina, dependência de Mn^{2+} e utilização de DNA fita simples como molde (HODO e HATCHER, 1986).

Nos tripanossomatídeos as RNAs polimerases I e III transcrevem os genes de rRNAs, tRNAs e pequenos RNAs nucleolares (snoRNA) (NAKAAR et al., 1994). Existem também alguns snoRNAs transcritos como parte de unidades transcricionais policistrônicas da polimerase II (DUNBAR et al., 2000; XU et al., 2001). Os mecanismos envolvidos na regulação da expressão de genes em tripanossomatídeos ainda permanecem desconhecidos.

O fato da transcrição de mRNAs ser essencialmente policistrônica, com o posterior processamento dos transcritos primários por trans-splicing (CLAYTON, 2002) indica que a regulação da expressão gênica ocorre principalmente (se não exclusivamente) por mecanismos pós-transcricionais. Assim, os mecanismos de regulação podem ocorrer no processamento do transcrito primário, no transporte dos transcritos processados do núcleo para o citoplasma, na estabilidade dos transcritos ou na seleção das seqüências a serem traduzidas.

O controle da estabilidade dos mRNAs é considerado como um dos mecanismos fundamentais na regulação da expressão gênica em eucariotos (GUTIÉRREZ, MACINTOSH e GREEN, 1999). Esse se torna particularmente relevante em tripanossomas podendo ser influenciado pela maquinaria basal de decaimento de RNA, fatores regulatórios responsivos a diferentes estímulos e componentes de degradação seqüência-específicos.

1.2.6. Proteínas com motivo Zinc Finger

Entre as proteínas que promovem a desestabilização dos mRNAs encontra-se uma classe de proteínas denominadas de proteínas com motivo CCCH de interação com o íon zinco (do inglês, CCCH zinc finger proteins), cujo papel desse motivo nesse processo ainda é pouco conhecido, mas aparentemente extremamente relevante (HENDRIKS e MATTHEWS, 2005). Membros dessa família de proteínas contêm um ou mais motivos CCCH (CCCH zinc-finger motif).

O nome do motivo está relacionado aos resíduos de aminoácidos cisteína e histidina conservados em uma seqüência de 18 resíduos de aminoácidos

(Cx₈Cx₅Cx₃H, onde x indica aminoácidos variáveis). Foi também identificada em tripanosomatídeos uma variante desse motivo CCCH tendo como sequência Cx₁₀Cx₅CxH que é ocasionalmente encontrado em associação com a Cx₈Cx₅Cx₃H (IVENS et al., 2005).

Esse motivo pode apresentar variações na quantidade de resíduos de cisteína e histidina. Foram caracterizadas proteínas com o motivo CCHH, CCHC, CCCC coordenadas pelo íon Zn²⁺. Estas variáveis do motivo zinc finger estão relacionadas a diferentes funções, podendo elas estarem relacionadas com a interação com RNA, DNA e proteínas (BROWN, 2005).

O motivo CCCH é encontrado em diversas proteínas, algumas ainda com funções desconhecidas, em várias espécies de células eucarióticas, de organismos unicelulares a metazoários. Essas proteínas têm a propriedade de se ligar ao RNA controlando sua estabilidade e estão envolvidas em vários aspectos do controle da homeostase celular e diferenciação. (BAI e TOLIAS, 1996; MELLO et al., 1996; TABARA et al., 1999; HENDRIKS et al., 2001; GAO, GUO e GOFF, 2002; LAI, KENNINGTON e BLACKSGEAR, 2002).

O primeiro relato sobre a ocorrência deste tipo de proteínas em tripanossomatídeos foi a caracterização de dois genes em *T. brucei* que codificam proteínas com motivos CCCH (*TbZFP1* e *TbZFP2*) e que têm papel importante no processo de diferenciação desse parasita (HENDRIKS et al., 2001). Demonstrou-se que *TbZFP1* é transitoriamente enriquecida durante a diferenciação do parasita, da sua forma sanguínea para a sua forma procíclica, representando a primeira descrição deste padrão de regulação em tripanossomatídeos: proteínas capazes de modular eventos fundamentais do ciclo do tripanossoma. A oblação da *TbZFP1* em ensaios *in vitro* demonstrou uma diferenciação assincrônica, da sua forma sanguínea para a procíclica e também uma diminuição do volume do cinetoplasto (HENDRIKS e MATTHEWS, 2005).

Recentemente em nosso laboratório foi caracterizado um gene de *T. cruzi* que codifica uma proteína da família zinc finger CCCH denominada *TcZFP1* que é homóloga a proteína *TbZFP1* (MÖRKING et al., 2004). Foi demonstrado que a *TcZFP1* se liga especificamente a oligorribonucleotídeos contendo seqüências ricas em nucleotídeos citosina, diferente de outras proteínas de mamíferos com este mesmo motivo, que ligam em seqüências ARE (A/U rich element) presentes na

região não traduzida 3' de certos mRNAs, indicando portanto, que estas proteínas tem diferente especificidade de seqüências alvos (LAI et al., 2000).

Os genomas de três importantes tripanossomatídeos (*T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*) contêm aproximadamente 80 genes que codificam proteínas com motivo CCCH (EL-SAYED et al., 2005). Uma análise mais detalhada feita no Instituto de Biologia Molecular do Paraná mostrou que esses 80 genes codificam 44 potenciais proteínas CCCH em *T. cruzi*. A análise da expressão dos genes CCCH usando microarranjos de DNA de *T. cruzi* mostrou que, pelo menos 16 dos 44 genes que codificam proteínas CCCH são expressos diferencialmente durante o processo de metaciclogênese, sugerindo que estas proteínas desempenham papéis diferenciados durante o ciclo de vida do parasita (PROBST, 2005).

Um conhecimento mais aprofundado sobre a modulação da estabilidade dos mRNAs e sua acessibilidade à maquinaria traducional bem como a identificação de elementos que estejam envolvidos em processos de diferenciação do parasita serão de grande importância para o desenvolvimento de possíveis alvos para o controle da enfermidade causada por este parasita.

2. OBJETIVO GERAL

A presente proposta é centrada no estudo sistemático e caracterização aprofundada dos demais membros da família de proteínas zinc finger CCCH, em específico a TcZFP4. Espera-se assim ganhar novos conhecimentos para a compreensão dos mecanismos de expressão gênica em *T. cruzi* e é muito provável que mecanismos semelhantes sejam encontrados nos outros tripanossomatídeos.

O estudo das proteínas da família zinc finger CCCH poderá permitir a caracterização de vias de regulação baseadas na alteração da estabilidade dos mRNAs ou aumentar o conhecimento sobre a modulação do decaimento estágio-específico dos mRNAs ou a acessibilidade dos mRNAs à maquinaria traducional.

2.1. Objetivos específicos

1. Amplificação por PCR do gene *TcZFP4* do *T. cruzi* que codifica uma proteína com motivo zinc finger CCCH de interação com o íon zinco.
2. Clonagem do gene *TcZFP4* e obtenção de sua sequência completa;
3. Expressão do gene *TcZFP4* em sistemas bacterianos;
4. Purificação da proteína TcZFP4 recombinante;
5. Produção de anticorpo policlonal contra a proteína recombinante TcZFP4;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Reagentes

Procedência dos reagentes mais utilizados:

Amersham-Pharmacia Biotech: dNTPs; plasmídio de expressão pGEXB; Hybond-C[®].

Appligene: IPTG

BioRad: Acrilamida; Agarose (ultra pure DNA grade); Azul de bromo fenol; Bis-acrilamida.

Invitrogen: BenchMark[™] Protein Ladder; Benchmark[™] prestained; EDTA; Fenol; Tris; *Taq* DNA polimerase; 1Kb Plus DNA ladder, NBT (nitroblue tetrazolium), BCIP (5-bromo-4-cloro-indolilfosfato).

Merck: Acetato de sódio; Acetato de Potássio; Ácido acético; Álcool Isoamílico, Clorofórmio, Etanol absoluto; Glucose; HCl; KCl; Maltose, MgCl₂; MgSO₄; Metanol, Na₂HPO₄; NaH₂PO₄; NaCl; NaOH.

Pierce: SDS.

Qiagen: plasmídeo de expressão pQE-30.

Roche: High Pure PCR Product Purification Kit

Sigma: Ampicilina; BSA; β -mercaptoetanol; Brometo de etídio; CaCl₂; Coomasie blue R/250; Kanamicina; NP-40.

3.1.2. Tampões e soluções

Fenol/Clorofórmio: Fenol Saturado (25V); Álcool Isoamílico (1V); Clorofórmio (24V).

PBS: NaCl 150 mM; Tampão fosfato 20 mM pH 8,0.

PBS/Tween: PBS contendo o detergente Tween na concentração de 0,05%.

Solução de Ponceau S: Ponceau S 0,5% em ácido acético 1%

Solução para Coloração de Géis de Proteína: Coomassie blue R-250 0,1% em metanol/ácido acético (45%/10%).

Solução I de Minipreparação de Plasmídeo: Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM.

Solução II de Minipreparação de Plasmídeo: NaOH 200 mM, SDS 1%.

Solução III de Minipreparação de Plasmídeo: Acetato de Potássio 3 M pH 4,8.

Tampão de Amostra para Géis de Proteína: Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 12%, EDTA 5 mM, azul de bromofenol 0,012%.

Tampão de bloqueio para “*Western blot*”: PBS 1x, Tween 20 a 0,05%, 5% de leite desnatado.

Tampão de Eletroforese para Géis de Proteína 5X: Tris 0,037 M, glicina 0,3 M pH 8,4, SDS 0,1%.

Tampão da Fosfatase Alcalina: Tris-HCl pH 9,5 100 mM, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM.

Tampão de Lise para Técnica da Palitagem (*Toothpick*): NaOH 50 mM, glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5 mM e azul de bromofenol (q.s.p.).

Tampão de Reação 10X para *Taq* DNA Polimerase: Tris-HCl 200 mM, (pH 8.4), KCl 500 mM, 50 mM MgCl₂

Tampão de Sonicação: Tris HCl 50 mM, NaCl 500 mM.

Tampão para T4 DNA Ligase: Invitrogen.

Tampão para Western Blot: Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%.

TBE: Tris base 89 mM; Ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,3.

TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 0,1 mM.

3.1.3. Microrganismos

3.1.3.1. *Trypanosoma cruzi*

Clone Dm28c (CONTRERAS *et al.*, 1988).

3.1.3.2. *Escherichia coli*

TOP 10F'- {*lac* I^q, *Tn* 10 (Tet^R) *mer* A Δ (*mrr-hsd* RMS-*mer*BC) θ 80 *lacZ* Δm15 Δ*lacX*74 *deoR* *recA*1 *ara* D139 Δ(*ara-leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (str^R) *end* A1 *nupG*.

M 15 - cepa comercial (Qiagen Inc) sem genótipo disponível.

3.1.4. Meios de cultura

Meio LB: 5 g de extrato de levedura/L, 10 g de bacto-peptona/L, 5 g de NaCl/L.

Meio LB/Amp/Agar: 5 g de extrato de levedura/L, 10 g de bacto-peptona/L, 5 g de NaCl/L, Agar 15 g/L, Ampicilina 100 µg/mL.

Meio LB/Amp/Kana/Agar: 5 g de extrato de levedura/L, 10 g de bacto-peptona/L, 5 g de NaCl/L, Agar 15 g/L, Ampicilina 100 µg/mL, Kanamicina 25 µg/mL.

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Amplificação do gene que codifica a proteína TcZFP4 em *Trypanosoma cruzi* por reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA genômico de *T. cruzi* (100 ng) foi utilizado como molde para a PCR, em uma reação com volume final de 100 µL, contendo 10 pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (TcZFP4 f: 5' GGG GGA TCC ATG ATT CTT CGT ACA GCG GGT GCG TCG 3' e TcZFP4 r: 5' GGG AAG CTT TCA TTG ATA ATT TGC GCC GTA CCG AAC ACC 3'), tampão para a enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen®) com concentração final de 1x. Duzentos µM de dNTPs (dinucleotídeos trifosfatados) e 2,5 unidades da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen®). A reação foi processada em um termociclador Perkin-Elmer, modelo 2400 de acordo com o seguinte protocolo: desnaturação à 94° C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos consecutivos de desnaturação à 94° C por 30 segundos, hibridação dos oligonucleotídeos iniciadores ao DNA à 55° C por 30 segundos, alongamento da cadeia de DNA à 72° C por 45 segundos e finalmente, um período de alongamento de 5 minutos à 72° C.

As extremidades dos oligonucleotídeos iniciadores f e r possuem, respectivamente, sítios para as enzimas de restrição *Bam* HI e *Hind* III.

O produto de reação da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose em TBE com concentração final 1%, com voltagem constante de 80 Volts.

3.2.2. Digestão do Plasmídeo de Expressão pQE-30 com *Bam*HI e *Hind*III

O plasmídeo de expressão pQE-30 (Qiagen®) foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e extraído com fenol/clorofórmio. Em seguida, o plasmídeo

linearizado foi precipitado com 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 6.0 e dois volumes de etanol absoluto por 30 minutos no gelo, centrifugado a 12000 g por 5 min, lavado com 1mL de etanol 70%, centrifugado outra vez nas mesmas condições citadas acima e ressuspensão em TE.

3.2.3. Clonagem do produto de PCR no vetor de expressão pQE30 (Qiagen®)

O produto da PCR foi purificado utilizando o sistema *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche®), segundo as recomendações do fabricante. O material purificado foi digerido primeiramente com a enzima de restrição *HindIII* e após a sua inativação a uma temperatura de 65° C por 20 minutos foi digerida com a enzima de restrição *BamHI*. Após este processo a amostra foi repurificada utilizando o mesmo sistema anteriormente descrito de purificação de produto de PCR.

Para a ligação entre inserto e vetor, 10 ng do inserto purificado foram ligados a 100 ng do vetor (proporção molecular entre vetor e inserto: 1:3) em uma reação com volume final de 10 µL contendo o tampão da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen®) com concentração final de 1x e 1 µL (0,3 unidades) da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen®). O volume final de reação foi ajustado com água ultrapura (18,2 mΩs). A reação foi incubada em banho-maria à 16° C por 16 horas, e então usada para transformar *E.coli* TOP10F' quimicamente competente pelo tratamento com cloreto de cálcio.

3.2.4. Transformação de *Escherichia coli* quimicamente competente (cepa Top 10F')

Após este período a reação de ligação foi misturada com uma alíquota de bactéria *Escherichia coli*, cepa Top 10F' cálcio competente segundo protocolo padrão (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989). Esta mistura foi então incubada por 30 minutos em gelo para a adsorção dos plasmídeos na membrana da célula bacteriana. Após este tempo a mistura foi transferida para um banho-maria à 42° C por 2 minutos, para a introdução do plasmídeo na célula. Após o choque térmico as células foram incubadas novamente no gelo por 2 minutos para o restabelecimento da membrana da célula e então foi acrescentado 1 mL de meio LB.

Esta cultura foi incubada à 37° C sob agitação leve durante 1 hora. Após este período, alíquotas de 50, 100 e 300 µL foram espalhadas em placas de Petri contendo meio LB e ágar suplementado com o antibiótico ampicilina 100 µg/mL. O plasmídeo pQE30 possui um gene que codifica resistência à ampicilina. As placas foram então incubadas à 37° C por 16 a 18 horas. As colônias presentes foram analisadas pela técnica de palitagem (Toothpick).

3.2.5. Técnica de palitagem para seleção de clones positivos (Toothpick)

Após transformação nas células TOP 10F' cálcio competentes, foi feita a seleção dos clones positivos através da técnica de palitagem, que trata da análise da presença de plasmídeos recombinantes nas colônias. Esta técnica consiste na retirada da colônia com o auxílio de um palito de dente estéril da placa, e submissão dessa colônia a um processo no qual é feita a retirada do plasmídeo da célula transformada. As colônias foram coletadas com o auxílio de palitos de dente (toothpick) estéreis e transferidas para o fundo de tubos de micro-centrifuga numerados. Com o mesmo palito, foi inoculado meio LB sólido de tal maneira que se obtivesse uma réplica das colônias que foram analisadas (placa-mãe). Para que este plasmídeo fosse retirado foi necessário lisar a célula transformada. Para isto foi utilizado o tampão de lise básica, composto por NaOH 50 mM que desnatura os cromossomos e plasmídeos de DNA, Glicerol 5% que facilita a aplicação no gel de agarose, SDS 5% (dodecil sulfato de sódio) que desnatura as proteínas da bactéria, EDTA 0,5mM (edetato de cálcio dissódico) que lesiona a membrana celular e azul de bromo fenol para corar a solução. Foram aplicados 10µL dessa solução sobre as bactérias e essa preparação foi levada a um vórtex por cerca de 10 segundos e então deixada por 10 minutos em banho-maria à 65°C, uma vez que essa temperatura auxilia a lise da bactéria. Após este período as amostras foram aplicadas em um gel de agarose 1%, juntamente com um controle (plasmídeo utilizado na ligação, porém sem estar digerido e sem a presença do inserto).

Depois da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL) por aproximadamente 20 minutos e lavado com água ultrapura. O DNA foi observado sob luz ultravioleta. O gel foi fotografado no sistema de foto-documentação UVP(Biorad®).

3.2.6. Seqüenciamento do gene *TcZFP4*

Os clones positivos foram cultivados em meio LB/AMP à 37° C por 16 horas e então seus plasmídeos foram extraídos e purificados utilizando o sistema *Plasmid Miniprep Purification kit* (Qiagen®), segundo as recomendações do fabricante. Este plasmídeo purificado foi então submetido ao seqüenciamento.

A seqüência nucleotídica do gene *TcZFP4* clonado no vetor pQE30 foi determinada por seqüenciamento automático (seqüenciador de DNA da Applied Biosystems Inc. modelo 3100), com o *kit Big Dye Terminator v.3.0* conforme descrição do fabricante. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o seqüenciamento foram o RBS e o RS, que hibridizam em regiões do vetor que flanqueiam os sítios de clonagem. São eles: RBS: 5' GAA TTC ATT AAA GAG GAG AAA 3' e RS: 5' CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG G 3'.

A seqüência de DNA foi analisada usando algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1998) acessado através da página do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.2.7. Transformação de *Escherichia coli* quimicamente competente (cepa M15)

Como já dito, o plasmídeo pQE30 possui um gene que codifica resistência a ampicilina e a cepa M15 possui um plasmídeo, pREP4, que codifica a resistência a canamicina. Por isso, as células M15, após a transformação conforme o item 3.2.4 com o produto de miniprep proveniente da cepa Top 10 F', são cultivadas em meio LB/Agar contendo ambos os antibióticos, ampicilina 100 µg/mL e canamicina 15 µg/mL.

O plasmídeo pREP4 ainda possui a seqüência gênica correspondente ao repressor Lac; esta característica permite que o gene inserido no vetor pQE30 seja expresso apenas na presença de um indutor. Em outras palavras, isso possibilita a regulação da expressão gênica em *E.coli*.

3.2.8. Expressão do gene *TcZFP4* em pQE30 por indução com IPTG

Um clone recombinante transformado em bactéria cálcio competente da cepa M15 (denominado pQE30TcZFP4 11) foi cultivado em 2 mL de LB/AMP/KANA à 37° C por 16 a 18 horas com agitação leve (pré-inóculo). Foram então adicionados 200 µL do pré-inóculo a dois tubos contendo 2 mL de meio LB/AMP/KANA em cada tubo. Essas culturas foram incubadas à 37°C por cerca de 2 horas. A um dos tubos foi adicionado IPTG na concentração final de 2 mM. Os dois tubos foram então incubados novamente à 37° C por 3 horas.

As bactérias foram coletadas após centrifugação a 12.000 x g por 2 minutos em temperatura ambiente. Os sobrenadantes das culturas foram descartados e os sedimentos bacterianos formados foram ressuspensos em 75 µL de PBS 1X. Nesta suspensão adicionou-se 25 µL de tampão de amostra para proteínas 4x. As amostras foram vigorosamente agitadas, fervidas por 5 minutos e analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) a 30 mA.

Este gel então foi corado com solução de coomassie blue R250 (Sigma®) e descorado, com solução contendo metanol 4% e ácido acético 7,5%.

3.2.9. Teste da solubilidade da proteína recombinante *TcZFP4* expressa em *E. coli*

O clone recombinante pQE30TcZFP4 11 foi cultivado em 2 mL de meio LB/AMP/KANA e induzido com IPTG como descrito anteriormente. O sedimento bacteriano foi coletado nas mesmas condições descritas acima e ressuspenso em 400 µL de tampão PBS. As bactérias foram lisadas em aparelho ultra-som Cole-Parmer, modelo 2400, 300 Watts, com quatro pulsos de 15 segundos cada na potência quatro. Essa solução foi então centrifugada a 12.000 x g, à 4° C por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado em um novo tubo e a este adicionado tampão de lise de proteínas 4x de maneira a se obter uma concentração final de 1X. O sedimento foi ressuspendido no mesmo volume da amostra sobrenadante em PBS 1X acrescidos do volume de tampão de lise de proteínas 4X suficiente para

concentração final de 1X. Aliquotas do sobrenadante e do sedimento foram analisados em SDS-PAGE 15 %, conforme descrito no item anterior.

3.2.10. Obtenção da proteína quimérica TcZFP4 + GST

A fim de aumentar a solubilidade da proteína TcZFP4 no sistema bacteriano foi feita a clonagem em um vetor que expressa a proteína de interesse fusionada à proteína Glutathione S-transferase. Este vetor é chamado de pGEX B (Pharmacia Biotech®). Para a clonagem da TcZFP4 neste sistema o vetor foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III da mesma forma descrita no item 3.2.2. Foi realizada análise para o reconhecimento dos clones positivos (idem item 3.2.5.). Em tempo, sua expressão foi realizada de maneira semelhante ao item 3.2.7, porém com concentração final do IPTG de 0,3 mM segundo especificação do fabricante. Esse vetor de expressão de proteína quimérica, assim como o plasmídeo pREP 4 presente na cepa M15 de *E. coli*, possuem a sequência gênica correspondente ao repressor *Lac*. Esta característica permite que o gene contido na construção do plasmídeo seja expresso apenas na presença de um indutor IPTG, possibilitando assim o controle da expressão gênica na *E. coli*.

3.2.11. Ensaio do tipo Western Blot

Este método consiste no reconhecimento de antígenos por anticorpos específicos mono ou policlonais. Esse procedimento foi realizado conforme protocolo descrito por TOWBIN, STAHELIN e GORDON, 1979. Extratos de *E. coli* expressando ou não a TcZFP4 e proteína purificada TcZFP4 foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15% à 30mA. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C). Após a transferência a membrana foi incubada em tampão de bloqueio, à temperatura ambiente por 1 hora. Após esta incubação, a membrana foi transferida para uma solução de PBS 1x, Tween 20 a 0,05%, contendo o anticorpo monoclonal comercial Anti-Histidina (Promega), na diluição de 1:3000 por 1 hora a 37°C. Posteriormente foi lavada por 3 vezes durante 5 minutos cada, com PBS 1x, Tween 20 a 0,05%,. A membrana após este processo foi então incubada na solução PBS 1x, Tween 20 a

0,05%, contendo anticorpo secundário Anti mouse IgG AP conjugado (Promega), na diluição de 1:7500 durante 40 minutos em temperatura ambiente. Após este período a membrana foi novamente lavada em PBS 1x, Tween 20 a 0,05%, e revelada com 66µL de NBT 50 µg/mL (Promega) e 33 µL de BCIP 50 µg/mL (Promega) em 10 mL de tampão da enzima fosfatase alcalina. A revelação foi interrompida por lavagens em água ultrapura.

3.2.12. Purificação de proteína através de gel preparativo de poliacrilamida

Uma cultura com volume de 220 mL de pQE30 TcZFP4 11 foi realizada conforme descrito no item 3.2.8. As bactérias foram coletadas após centrifugação a 6.500 x g, à 4° C por 20 minutos e ressuspensas em 4 mL de tampão de lise. As células foram lisadas por ultra-som (cinco pulsos de 15 segundos cada, na potência quatro). Essa amostra foi então centrifugada a 12.000 x g à 4° C, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento bacteriano ressuspensado em 3 mL de PBS 1X e 1 mL de tampão de amostra de proteína 4X. A amostra foi fervida por 5 minutos e após este período vigorosamente agitada. Esta solução então foi aplicada em um gel de poliacrilamida desnaturante SDS-PAGE 15%, juntamente com o marcador molecular pré-corado (Benchmark™ prestained - Invitrogen®). Este gel foi submetido a uma corrente de 20 mA por cerca de 16 horas. O gel foi colocado numa solução de KCl 100 mM e mantido a 4° C por cerca de 30 minutos para o evidenciamento das bandas protéicas. Essa solução precipita sobre a amostra marcando as regiões onde se apresentam grandes quantidades de proteína. A banda que representa a proteína recombinante, identificada por meio da comparação da sua massa molecular com a do marcador, foi então cortada do gel e retirada deste através da técnica de eletroeluição na qual a banda do gel cortada é colocada em um saco de diálise e submetida a uma voltagem de 50 mA por 2 ou 3 horas, fazendo assim com que a proteína seja liberada do gel.

3.2.13. Obtenção de anticorpos policlonais contra TcZFP4

Após a purificação de acordo com o item 3.2.12 foi realizada a quantificação da proteína por meio de comparação da intensidade da banda protéica obtida com a

banda de uma proteína de concentração conhecida (2µg/µl de albumina bovina sérica – BSA). Determinada a concentração, 50 µg da proteína TcZFP4 foram adicionados a 77µL de hidróxido de alumínio (Alugel®), que foi o adjuvante de escolha para esse procedimento. Adjuvantes são substâncias que são administradas em conjunto com o antígeno objetivando um aumento na resposta imunológica da cobaia. Após 20 minutos, conforme especificação do fabricante foi feita a inoculação.

Foram utilizados camundongos Balb/c, machos, com 2 a 3 meses de vida, pesando entre 25 a 35 gramas, mantidos no biotério do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). Esse procedimento foi aceito pelo comitê de ética desta universidade sob o protocolo de número 139 (em anexo). Os animais foram selecionados pela análise do soro pré-imune, que consistiu na retirada de 500µl de sangue da veia caudal do animal anestesiado em éter etílico. O sangue foi deixado em banho-maria à 37°C por 30 minutos para a retração do coágulo e então centrifugado para a obtenção do soro, e a partir deste, foi feita análise por meio de ensaio do tipo *Western Blot* para determinar se o camundongo pré-imunizado apresentava ou não anticorpos semelhantes aos que seriam produzidos pela nossa proteína, capazes de reconhecer proteínas de massa molecular semelhante a da TcZFP4 presentes no extrato de *T.cruzi*.

A proteína foi inoculada intraperitonealmente em camundongos anestesiados por éter etílico. Esse procedimento foi repetido uma vez por semana, durante um período de 30 dias. Após 30 dias, foram retirados aproximadamente 500µl de sangue da veia caudal do animal anestesiado em éter etílico para a titulação do anticorpo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O controle da estabilidade dos mRNAs é particularmente importante no *Trypanosoma cruzi*, já que a regulação da expressão gênica desse parasita ocorre principalmente por mecanismos pós-transcricionais (CLAYTON, 2002). Através deste e do controle da tradução dos mRNAs, o parasita é capaz de se adaptar rapidamente às diferentes condições impostas durante seu ciclo de vida.

No grupo das enzimas que promovem o controle do processamento, estabilidade, distribuição e tradução dos mRNAs em diversos sistemas eucarióticos encontram-se as proteínas com o domínio CCCH com interação com o íon zinco. Contudo o papel dessas proteínas na regulação da expressão gênica do *T. cruzi* ainda é pouco conhecido.

Um exemplo da influência que as proteínas da família zinc finger que possuem o motivo funcional CCCH podem apresentar sobre o processamento de RNAs, é o da proteína tbCPSF30 do *T. brucei*. Essa proteína é homóloga a uma subunidade do CPSF (fator de especificidade da clivagem e poliadenilação), requerida para a formação da região 3' não traduzida de mRNAs em leveduras e mamíferos. A ausência da proteína acarreta o processamento aberrante do RNA policistrônico das tubulinas, com posterior morte celular o que sugere que a tbCPSF30 é por si só essencial para o parasita, ou que o processamento ineficiente ou inapropriado do RNAs devido a sua depleção é letal (HENDRIKS, ABDUL-RAZAK e MATTHEWS, 2003)

Dentre os genes que codificam proteínas com domínio funcional CCCH em *T. cruzi* encontra-se o gene que codifica a proteína denominada TcZFP4. O produto gênico referente a TcZFP4 foi primeiramente identificado por meio de análises de genômica funcional do processo de diferenciação da forma tripomastigota metacíclica para a forma amastigota. A partir desse dado de sequência foi construído um par de iniciadores para amplificar por PCR a região codificante do gene. A amplificação tomou como molde o DNA total do clone Dm28c de *T. cruzi*. A amplificação se mostrou eficiente (Figura 5) e o seqüenciamento do produto amplificado mostra que *TcZFP4* possui região codificante de 654 nucleotídeos, não possuindo similaridade significativa com nenhum gene de outros organismos.

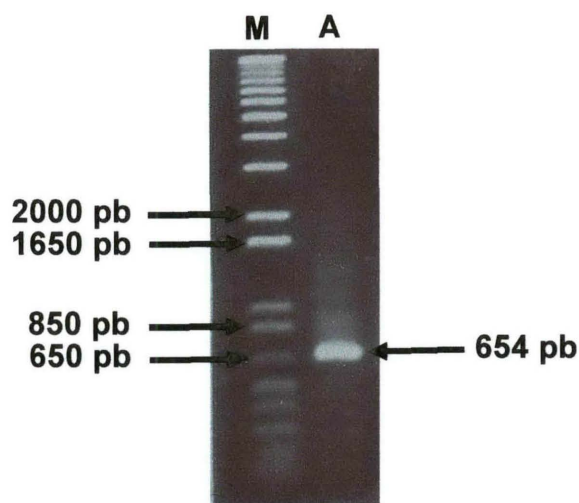
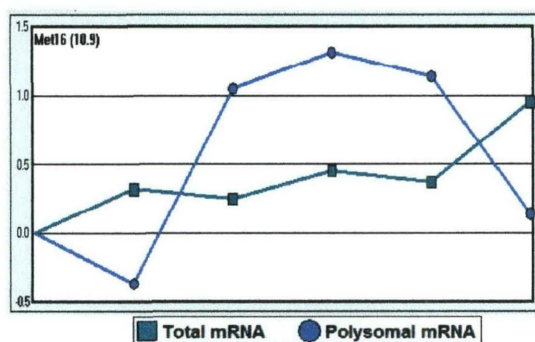


FIGURA 5 - AMPLIFICAÇÃO DO GENE *TcZFP4* POR PCR. Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio evidenciando o produto de PCR amplificado. M = marcador; A = amostra.

4.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *TcZFP4*

Através de análises preliminares da expressão do gene realizada com a utilização da tecnologia de microarranjo de DNA (PROBST, 2005), *TcZFP4* foi identificado como um transcrito que tem seus níveis transitoriamente elevados durante o processo de metaciclogênese do *T. cruzi*. Foi demonstrado que o nível de mRNA de *TcZFP4* na fração polisomal aumenta consideravelmente após o parasita se aderir à parede do frasco de cultura (3h, 12h e 24h) (Gráfico 1).

Uma vez que o RNA polisomal está engajado na tradução de proteínas é viável supor que o aumento do nível do mRNA da *TcZFP4* na fração polisomal nos parasitas aderidos se deva a maior necessidade dessa proteína nesse estágio. Sabemos que a aderência dos parasitas ao intestino do inseto vetor, ou no caso da metaciclogênese *in vitro*, à parede da garrafa, é um evento importante para o processo de diferenciação do *T. cruzi*, muito embora ainda não saibamos quais os eventos moleculares que estão atuando nesse processo.



Epi Str 3h 12h 24h Meta

GRÁFICO 1 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TcZFP4. Epi = epimastigota; Str = estresse; 3h, 12h e 24h= epimastigotas aderidos ao frasco de cultura analisados após 3h, 12h e 24h; Meta = metacíclico.

Como foi visto por MÖRKING et al, 2004, a proteína TcZFP1 está aumentada na fração polissomal especificamente quando o parasita sofre estresse por 2 horas, em meio pobre em nutrientes. Este fato demonstra que diferentes membros da família CCCH em *T. cruzi* apresentam padrões de expressão gênica distintos, o que leva a concluir que estes são necessários em pontos distintos e específicos do ciclo de vida do parasita.

4.2. SEQÜENCIAMENTO DO GENE *TcZFP4*

Uma alíquota contendo o DNA plasmidial do pQE30+*TcZFP4* foi enviada para o seqüenciamento. Através do seqüenciamento do gene que codifica a proteína TcZFP4, foi possível identificar um domínio rico em resíduos dos aminoácidos glutamina e lisina além do motivo funcional CCCH de interação com o íon zinco (Figura 6). Observou-se que essa seqüência possui 215 aminoácidos.

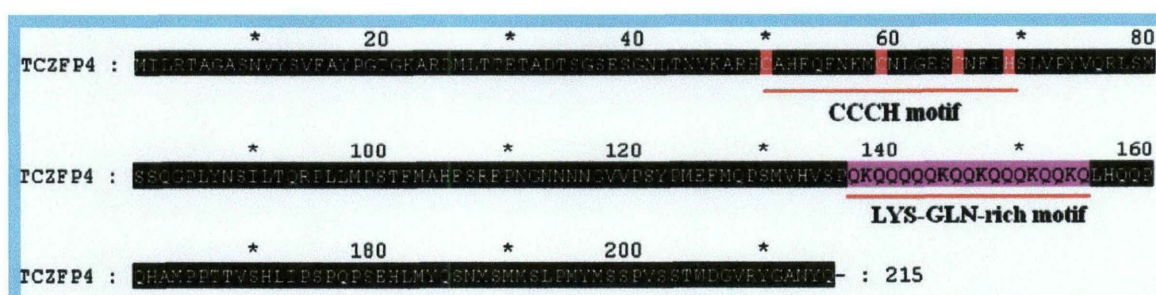


FIGURA 6 – SEQUÊNCIA DE AMONIÁCIDOS DA TcZFP4. Região destacada mostrando o motivo funcional $Cx_8Cx_5Cx_3H$ e o domínio rico em resíduos de aminoácidos glutamina e lisina.

Proteínas reguladoras geralmente contêm domínios adicionais que são envolvidos nas interações com outras proteínas reguladoras ou com cópias adicionais da mesma. A proteína TcZFP4 possui um domínio adicional rico em lisina e glutamina. A presença desse domínio rico em lisina e glutamina em outras proteínas está relacionado com a ativação da transcrição (GEKAKIS et al., 1998), capacidade de se ligar em fita simples e promove a interação proteína/proteína (WILKINS e LIS, 1999).

Esse domínio rico em lisina/glutamina (LYS-GLN-rich motif) está ligado a fatores de transcrição, e análises *in vitro* sugerem que ele pode também modular a ligação receptor/cofator em genes alvo (YAMAGUCHI e KUO, 1995). Esse fato sugere que talvez a TcZFP4 desempenhe um papel de regulação da expressão gênica em *T. cruzi*. Esse domínio presente em TcZFP4 pode ainda estar relacionado na formação de dímeros. Os dímeros podem se formar entre proteínas idênticas (um homodímero) ou entre proteínas diferentes (heterodímero), sendo que diferentes combinações parecem ter propriedades funcionais e regulatórias diferentes.

Em 2005, foi mostrado que duas proteínas pertencentes à família zinc finger CCCH, TcZFP1 e TcZFP2, interagem com a outra por meio de um domínio WW presente em TcZFP2 (CARO et al., 2005). A formação de dímeros é geralmente um pré-requisito para a funcionalidade de enzimas.

4.3. EXPRESSÃO DA TcZFP4 RECOMBINANTE EM *E. coli*

Uma das dificuldades para purificar proteínas de *T.cruzi* se deve ao fato de que, em muitos casos, a atividade bem como a quantidade dessas proteínas é regulada durante os ciclos celular e biológico. Portanto, a estratégia utilizada foi baseada na clonagem e expressão da TcZFP4 em um sistema heterólogo (bacteriano). A purificação das enzimas em larga escala utilizando esse tipo de sistema pode permitir o estudo de suas atividades mais facilmente, bem como se obter quantidades suficientes para futuros estudos cristalográficos.

Utilizamos o plasmídeo de expressão pQE30 (QIAGEN) para expressar TcZFP4 recombinante (Figura 7). Nesse sistema, a proteína recombinante é expressa juntamente com uma cauda de seis resíduos de histidina associada à porção amino-terminal da proteína recombinante, característica essa que permite sua purificação através da cromatografia de afinidade em resina de níquel-NTA (AUSUBEL et al., 1994). Os resíduos de histidina em pH maior do que 7.0 possuem carga negativa e, desse modo, interagem facilmente com as cargas positivas do íon níquel. A eluição da proteína é feita reduzindo-se o pH ou por competição com imidazol. Outra utilidade dessa cauda de histidina é a detecção da proteína em ensaios imunológicos do tipo Western Blot utilizando anticorpo específico contra os resíduos de histidina.

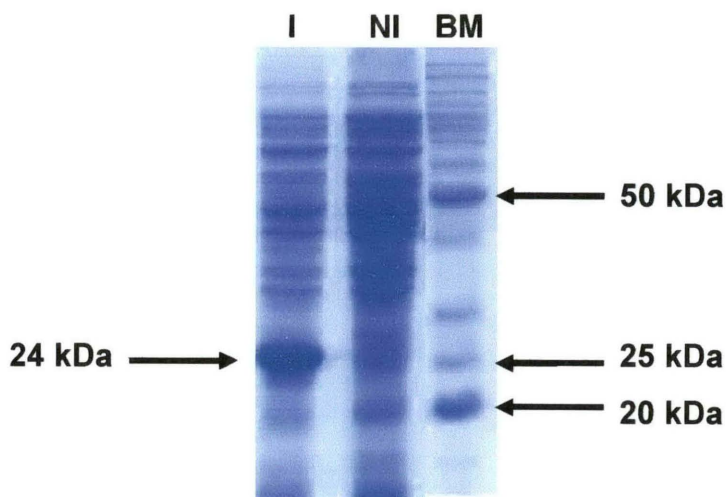


FIGURA 7 – EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TcZFP4 (24 kDa). Gel SDS-PAGE 15% corado com coomassie blue mostrando a expressão da proteína em sistema heterólogo utilizando o vetor de expressão pQE30. NI = extrato de bactéria não

induzido com IPTG; I = extrato de bactéria induzido com IPTG, BM = BenchMark™ Protein Ladder (marcador).

4.4. TESTE DA SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE TcZFP4 EXPRESSA EM *E. coli*

Antes da decisão sobre que estratégia de purificação seria utilizada, foi necessário fazer um teste de solubilidade para determinar se a TcZFP4 se encontra na forma solúvel ou localizada em corpúsculos de inclusão. A decisão de se uma proteína recombinante vai ser purificada sob condições nativas ou desnaturantes depende da solubilidade da mesma.

Observamos que, em condições pré-estabelecidas de tamponamento, TcZFP4 se encontra parcialmente solúvel, estando a maior quantidade de sua expressão contida na fração insolúvel do extrato protéico, sendo então utilizadas condições desnaturantes para a sua purificação. Na figura 8 é possível notar a presença da banda referente a TcZFP4 recombinante, com massa molecular de aproximadamente 24 kDa no extrato de *E. coli* obtido após indução com IPTG e nas amostras provenientes da fração solúvel (S) e insolúvel (P). Foi possível verificar que a proteína apresentava-se na forma insolúvel, presente em corpúsculos de inclusão. Portanto, a técnica utilizada para purificação foi a de gel preparativo.

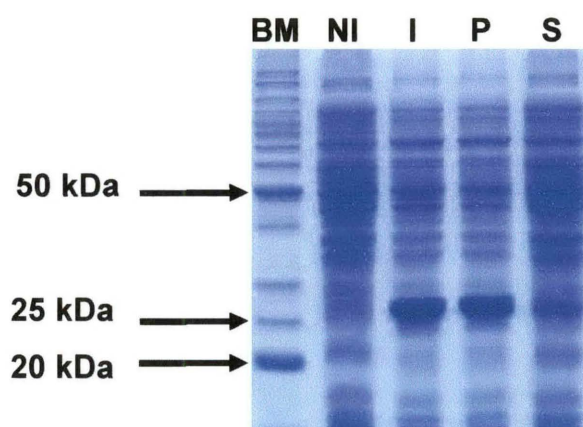


FIGURA 8 – TESTE DE SOLUBILIDADE. Gel SDS-PAGE 15% corado com coomassie blue mostrando a proteína presente predominantemente no sedimento bacteriano e praticamente ausente no sobrenadante. BM = BenchMark™ Protein

Ladder (marcador); NI = extrato de bactéria não induzido com IPTG; I = extrato de bactéria induzido com IPTG; P = pellet bacteriano após sonicação; S = sobrenadante após a sonicação.

O fato da proteína se apresentar na forma insolúvel, talvez seja devido à presença de uma grande quantidade de resíduos de prolina na sua estrutura primária e como este resíduo de aminoácido é apolar e responsável por uma maior rigidez no compostos que o compõem isto infere então a proteína TcZFP4 recombinante uma característica hidrofóbica. Uma opção para a futura obtenção de amostra solúvel é o desenho de pares de primers que amplifiquem a sequência nucleotídica de TcZFP4 excluindo a parte codificante dessa região. Já que a mesma se encontra relativamente distante da porção codificante do motivo funcional CCCH, é possível que se possa manter a estrutura funcional da molécula, podendo assim ser utilizada no reconhecimento de oligonucleotídeos sintéticos na técnica de ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA), bem como ser utilizada em outros ensaios de análise de funcionalidade.

4.5. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TcZFP4 UTILIZANDO A TÉCNICA DE GEL PREPARATIVO

Como a proteína se encontra na forma insolúvel a metodologia utilizada para a purificação foi a técnica de gel preparativo. Na figura 9 esta demonstrado a proteína purificada.

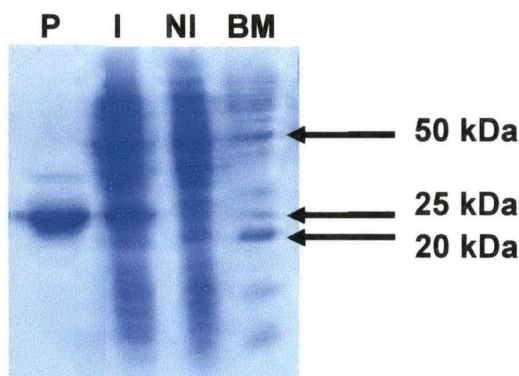


FIGURA 9 – PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE TcZFP4. Gel SDS-PAGE 15% corado com coomassie blue mostrando a proteína purificada. BM = BenchMark™ Protein Ladder (marcador); NI = extrato de bactéria não induzido com

IPTG; I = extrato de bactéria induzido com IPTG; P = proteína recombinante TcZFP4 purificada através da técnica de gel preparativo.

4.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA TcZFP4 POR WESTERN BLOT

Através da técnica de Western Blot foi possível confirmar a natureza da fração proteica obtida por meio da técnica de gel preparativo. Esta técnica possibilita a identificação da proteína por massa molecular e pelo reconhecimento da cauda de histidina presente na TcZFP4 recombinante pelo anticorpo monoclonal anti-etiqueta de histidina.

Foi detectado que a purificação da proteína ocorreu de maneira satisfatória (Figura 10) possibilitando o seu uso para inoculação em camundongos com o objetivo da obtenção de anticorpo policlonal anti-TcZFP4.

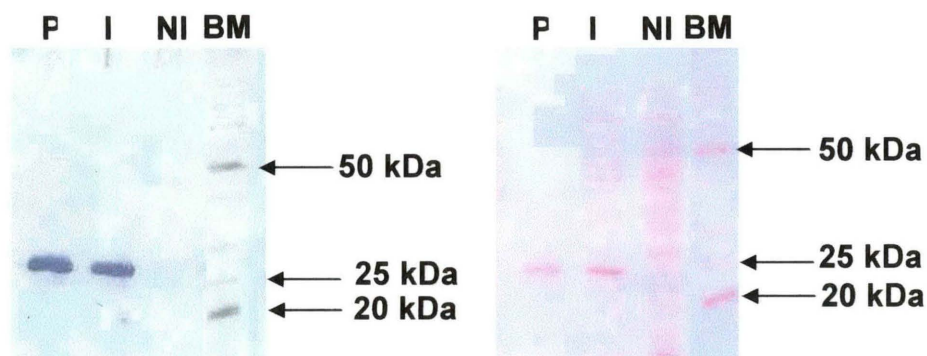


FIGURA 10 – WESTERN BLOT PARA VERIFICAR EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TcZFP4. Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau S para evidenciar o extrato de bactéria e revelada por fosfatase alcalina. BM = BenchMark™ Protein Ladder (marcador); NI = extrato de bactéria não induzido com IPTG; I = extrato de bactéria induzido com IPTG; P = proteína recombinante TcZFP4 purificada.

4.7. OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA TcZFP4

A partir da proteína purificada, foi realizada a sua quantificação baseada na comparação da banda referente a TcZFP4 com uma proteína de concentração conhecida. A proteína recombinante TcZFP4 foi então inoculada em camundongos Balb/c para a obtenção de anticorpos policlonais. Após 5 inoculações foram retirados cerca de 500 µl de sangue da veia caudal para a verificação do título do anticorpo através de ensaios de Western Blot utilizando extratos das formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*. Não foram detectadas marcações na membrana de nitrocelulose proveniente do Western Blot mesmo quando baixas diluições do soro foram utilizadas.

Os anticorpos policlonais são uma importante ferramenta para detecção da proteína em ensaios imunológicos, como Western Blot e imunofluorescência entre outras técnicas. Porém a produção do anticorpo anti-TcZFP4 não se mostrou satisfatória, fenômeno este que pode estar relacionado ao fato de a proteína apresentar baixo potencial imunogênico quando inoculada em camundongos. Deve então se buscar uma técnica que potencialize a imunogenicidade dessa proteína ou que desafie o sistema imunitário do animal de maneira satisfatória, como por exemplo, a utilização de substâncias associadas (acrilamida, células tumorais, etc.) à proteína que estimulem uma resposta imunitária mais ativa. Podem-se utilizar também peptídeos sintéticos para a produção desse anticorpo.

4.8. OBTENÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA TcZFP4 + GST

Uma vez que a proteína expressa apresentou-se insolúvel optou-se pela estratégia de expressão de uma proteína quimérica TcZFP4 + GST. Esse procedimento objetiva a obtenção da proteína na forma solúvel, pois é sabido que proteínas quiméricas tem maior possibilidade de apresentarem-se nessa forma em sistemas heterólogos (ROSALES e LEE, 2000). O gene *TcZFP4* foi clonado em um plasmídeo de expressão de proteína fusionada denominado pGEXB. Foram encontrados clones positivos como observado na Figura 11.

A expressão de proteínas de interesse fusionadas a proteínas específicas, fragmentos de proteínas ou a uma pequena sequência peptídica repetitiva (etiqueta),

traz inúmeros benefícios, tais como o aumento da solubilidade do produto recombinante de interesse e conseqüente aumento da quantidade de produto para purificação. A proteína de fusão também auxilia na purificação, possibilitando que a TcZFP4 possa ser imediatamente purificada e/ou imobilizada, assim como permite a detecção e quantificação da mesma de forma confiável.

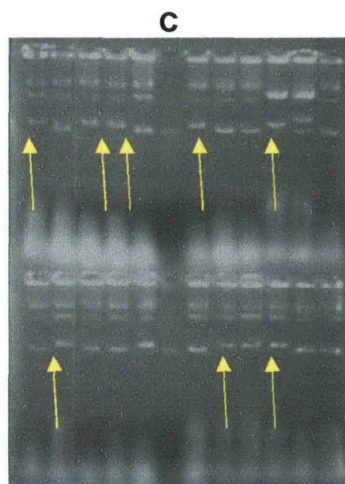


FIGURA 11 – TOOTHPICK DA LIGAÇÃO DO GENE *TcZPF4* EM VETOR DE EXPRESSÃO pGEXB. Gel agarose 1% corado com brometo de etídio. C = controle; flechas amarelas = clones positivos selecionados.

Os clones foram analisados através de PCR e confirmou-se que o gene *TcZFP4* esta presente nestes clones. Futuramente estes clones serão induzidos por IPTG para então se obter a proteína recombinante TcZFP4 na forma quimérica e provavelmente solúvel, possibilitando assim a continuidade deste trabalho.

5. CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível concluir que:

- A região codificante do gene *TcZFP4* contém 654 nucleotídeos e codifica uma proteína de 24 kDa contendo o um único motivo CCCH de interação com o íon zinco e um domínio rico em resíduos dos aminoácidos Lisina/Glutamina.
- A proteína TcZFP4 é expressa na forma insolúvel quando expressa a partir do plasmídeo de expressão pQE30 em sistema bacteriano.
- Foi possível a purificação da proteína pela eletroiluição da banda da proteína purificada do corpúsculo de inclusão.
- Através de análises por microarranjo de DNA foi possível demonstrar que a proteína TcZFP4 está sendo expressa diferencialmente durante a metaciclogênese do *T. cruzi*, sendo que seus níveis estão mais elevados se apresentam na fração polissomal dos parasitas epimastigotas aderidos à parede do frasco de cultivo.
- Para a obtenção de anticorpo policlonal da proteína TcZFP4 serão necessárias novas tentativas utilizando outras técnicas

6. REFERÊNCIAS

1. AGÊNCIA SAÚDE. **Santa Catarina: definido local de infecção do mal de Chagas.** Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=13948> notícia de 31/03/05. Acesso em 19 nov. 2005.
2. ANDRADE, Z.A. A patologia da doença de Chagas no homem. **Ann. Soc. Belge Med. Trop.** V.65 (sup.1), p.15-30, 1985.
3. ANDRADE, A.F.B.; ESTEVES, M.G.; ANGLUSTER, J.; GONZALES-PERDOMO, M.; GOLDENBERG, S. Chagas in cell surface carbohydrates during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **J. Gen. Microbiol.**, v.137, p.2845-2849, 1991.
4. AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOOREE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology.** New York, Green Publishing Associates and Wiley & Sons, 1994.
5. AYMERICH, S.; GOLDENBERG, S. The karyotype of *Trypanosoma cruzi* DM28c: comparison with other *Trypanosoma cruzi* strains and trypanosomatids. **Experimental Parasitology**, v.69, p.107-115, 1989.
6. BAI, C.; TOLIAS, P.P. Cleavage of RNA hairpins mediated by a developmentally regulated CCCH zinc finger protein. **Mol. Cell. Biol.**, v.16, p.6661-6667, 1996.
7. BONALDO, M.C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Journal of Cell Biology**, v. 106, p.1349-1358, 1988.
8. BÖKER, C.A.; SCAUB, G.A. Scanning electron microscopic studies of *Trypanosoma cruzi* in the rectum of its vector *Triatoma infestans*. **Z. Parasiten Kd.**, v.70, p.459-469, 1984.
9. BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v.27, p.347-382, 1973.
10. BRENER, Z. **O parasita: relações hospedeiro-parasita.** In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. BRENER, Z; ANDRADE, Z. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1979.
11. BROWN, S.R. Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. **Current Opinion in Structural Biology**, v.15, p.94-98, 2005.

12. CAMPBELL, D.A.; STURM, N.R.; YU, M.C. Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene. **Parasitol Today**, v.16 (2), p.78-82, 2000.
13. CARO, F.; BERCOVICH, N.; ATORRASAGASTI, C.; LEVIN, M.J.; VAZQUEZ, M.P. Protein interactions within the TcZFP zinc finger family members of *Trypanosoma cruzi*: implications for their functions. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.333, n.3, p.1017-1025, 2005.
14. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Parasites and parasitics diseases, blood born parasites.** Disponível em: <www.dpd.cdc.gov/dpdx> Acesso em 17 nov. 2005.
15. CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova morbidade do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, p.159-218, 1909.
16. CLAYTON, C.E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **Embo Journal**, v.21 (8), p. 1881-1888, 2002.
17. CONTRERAS, V.T.; MOREL, C.M.; GOLDENBERG, S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.14, p.83-96, 1985(a).
18. CONTRERAS, V.T.; SALLES, J.M.; THOMAS, N.; MOREL, C.M.; GOLDENBERG, S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined condition. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, p. 315-327, 1985(b).
19. DE SOUZA, W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v.1, n.3, p.1-21, 2002. doi:10.1186/1475-9292-1-3
20. DIAS, J.C.P. Control of Chagas disease in Brazil. **Parasitology Today**, v.3, p.336-341, 1987.
21. DIAS, J.C.P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease. A clinical epidemiological review. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 22, p.147-156, 1989.

22. DIAS, J.C.P., COURA, J.R. **Epidemiologia. Em: Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral.** 1 ed., Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, pp 33-66, 1997.
23. DUNBAR, D.A.; CHEN, A.A.; WORMSLEY, S.; BASERGA, S.J. The genes for small nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei* are organized in clusters and are transcribed as a polycistronic RNA. **Nucleic Acids Res.**; v.28, p.2855-2861, 2000.
24. EL-SAYED, N.M. et al. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science**, v.309 (5733), p.404-409, 2005.
25. ESTEVES, M.G.; GONZALES-PERDOMO, M.; ALVIANO, C.S.; ANGLUSTER, J.; GOLDENBREG, S. Changes in fatty acid composition associated with differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.59, p.31-34, 1989.
26. GAO, G.; GUO, X.; GOFF, S.P. Inhibition of retroviral RNA production by ZAP, a CCCH-type zinc finger protein. **Science**, v.297, 1703-1706, 2002.
27. GEKAKIS, N.; STAKNIS, D.; NGUYEN, H.B.; DAVIS, F.C.; WILSBACHER, L.D.; KING, D.P.; TAKAHASHI, J.S.; WEITZ, C.J. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. **Science**, v.280 (5369), p.1564-1569, 1998.
28. GOLDENBERG, S.; CONTRERAS, V.T.; BONALDO, M.C.; SALLES, J.M.; LIMA FRANCO, M.P.A.; LAFFAILE, J.J.M.; GONZALES-PERDOMO, M.; LINSS, J.; MOREL, C.M. *In vitro* differentiating systems for the study of differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* development. Molecular strategies of parasitic invasion. **UCLA Symposia on Molecular and Cell Biology**. New York: A.R. Liss, v.42, p.203-212, 1987.
29. HENDRIKS, E.F.; ROBINSON, D.R.; HINKINS, M.; MATTHEWS, K.R. A novel CCCH protein which modulates differentiation of *Trypanosoma brucei* to its procyclic form. **EMBO Journal**, v.20, n.23, p.6700-6711, 2001.
30. HENDRIKS, E.F.; ABDUL-RAZAK, A.; MATTHEWS, K.R. tbCPSF30 depletion by RNA interference disrupts polycistronic RNA processing in *Trypanosoma brucei*. **J Biol Chem**, v.278, n.29, p.26870-26878, 2003.
31. HENDRIKS, E.F.; MATTHEWS, K.R. Disruption of the developmental programme of *Trypanosoma brucei* by genetic ablation of TbZFP1, a differentiation-enriched CCCH protein. **Molecular Microbiology**, v.57(3), p.706-716, 2005.

32. HODO, H.G.; HATCHER, F.M. Multiple DNA-dependent RNA polymerases in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.19, p.77-181, 1986.
33. IVENS, A. C. et al. The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, p.436-442, 2005.
34. KLINGBEIL, M.M.; DREW, M.E.; LIU, Y.; MORRIS, J.C.; MOTYK, S.A.; SAXOWSKY, T.T.; WANG, Z.; ENGLUND, P.T. Unlocking the secrets of Trypanosome kinetoplast DNA network replication. **Protist**, v.152 (4), p.255-262, 2001.
35. KRIEGER, M.A.; ALMEIDA, E.; OELEMANN, W.; LAFAILLE, J.J.; PEREIRA, J.B.; KRIEGER, H.; CARVALHO, M.R.; GOLDENBERG, S. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. **Am J Trop Med Hyg.** 1992 Apr;46(4):427-34.
36. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p.680-685, 1970.
37. LAI, W.S.; CARBALLO, E.; THORN, J.M.; KENNINGTON, E.A.; BLACKSHEAR, P.J. Interaction of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger protein to AU-rich elements and destabilization of mRNA. **J. Biol. Chem.**, v.27, p.17827- 17837, 2000.
38. LAI, W.S.; KENNINGTON, E.A.; BLACKSHEAR, P.J. Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: non-binding tristetraprolin mutants exert an inhibitory effect on degradation of AU-rich element-containing mRNAs. **J Biol Chem**, v.277, n.11, p.9606-9613, 2002.
39. LAUFER, G.; SCHAAF, G.; BOLLGONN, S.; GÜNZL, A. *In vitro* analysis of α -amanitin-resistant transcription from the rRNA, procyclic acidic repetitive protein and variant surface glycoprotein gene promoters in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Cell Biol.**, v.19, p.5466-5473, 1999.
40. LAUFER, G.; GÜNZL, A. *In vitro* competition analysis of procyclin gene and variant surface glycoprotein gene expression site transcription in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.113, p.55-65, 2001.
41. MAIR, G.; SHI, H.; LI, H.; DJIKENG, A.; AVILES, H.O.; BISHOP, J.R.; FALCONE, F.H.; GAVRILESCU, C.; MONTGOMERY, J.L.; SANTORI, M.I.; STERN, L.S.; WANG, Z.; ULLU, E.; TSCHUDI, C.A. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA**, v.6, p.163-169, 2000.

42. MATTHEWS, K.R.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. **Gene Dev.**, v.8, p.491-501, 1994.
43. MELLO, C.C.; SCHUBERT, C.; DRAPER, B.; ZHANG, W.; LOBEL, R.; PRIESS, J.R. The PIE-1 protein and germline specification in *C.elegans* embryos. **Nature**, v.382, p.710-712, 1996.
44. MILEI, J.; MAUTNER, B.; STORINO, R.; SANCHES, J.A.; FERRANS, V.J.; Does Chagas disease exist as an undiagnosed form of cardiomyopathy in the United States? **American Heart Journal**, v.123, p.1732-1735, 1992.
45. MÖRKING, P.A.; DALLAGIOVANNA, B.M.; FOTI, L.; GARAT, B.; PICCHI, G.F.; UMAKI, A.C.; PROBST, C.M.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S.; FRAGOSO, S.P. TcZFP1: a CCCH zinc finger protein of *Trypanosoma cruzi* that binds poly-C oligoribonucleotides *in vitro*. **Biochem Biophys Res Commun**, v.319, n.1, p.169-177, 2004.
46. NAKAAR, V.; DARE, A.O.; HONG, D.; ULLU, E.; TSCHDI, C. Upstream tRNA genes are essential for expression of small nuclear and cytoplasmic RNA genes in trypanosomes. **Mol. Cell. Biol.**, v.14, p.6736-6740, 1994.
47. PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infectious Diseases**, v.1, p. 92-100, 2001.
48. PROBST, C.M. **Descrição da metaciclologênese de *Trypanosoma cruzi* pelo uso de microarranjos de DNA**. Curitiba, 2005. 174f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Instituto Oswaldo Cruz.
49. RASSI, A.JR; RASSI, A.; LITTLE, W.C. Chagas' heart disease. **Clinical Cardiology**, v.23, p.883-889, 2000.
50. ROSALES, J.L.; LEE, K-Y. Purification of dual-tagged intact recombinant proteins. **Biochemical and Biophysical Research and Communication**, v.273, 1058-1062, 2000.
51. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory 2nd ed., 1989.
52. TABARA, H.; HILL, R.J.; MELLO, C.C.; PRIESS, J.R.; KOHARA, Y. *Pos-1* encodes a cytoplasmic zinc-finger protein essential for germline specification in *C.elegans*. **Development**, v.126, p.1-11, 1999.

53. TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS, L.M.; WITTNER, M. Chagas' disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v.5, n.4, p.400-419, 1992.
54. TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.76, p.4350-4354, 1979.
55. ULLU, E.; MATTHEWS, K.R.; TSCHUDI, C. Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. **Mol. Cell. Biol.**, v.13, p.720-725, 1993.
56. WILKINS, R.C.; LIS, J.T. DNA distortion and multimerization: novel functions of the glutamine-rich domain of GAGA factor. **J Mol Biol.**, v.285 (2), p.515-25, 1999.
57. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Burdens and Trends**. Disponível em: <<http://www.who.int/ctd/chagas/burdens.htm>> Acesso em: 19 nov. 2005.
58. XU, P.; WEN, L.; BENEGAL, G.; WANG, X; BUCK, G.A. Identification of a spliced leader RNA binding protein from *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biol. Parasitol.**, v.112, p.39-49, 2001.
59. YAMAGUCHI, Y.; KUO, T. Functional analysis of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator interactions with aryl hydrocarbon receptor in the yeast two-hybrid system. **Biochemical Pharmacology**, v.50 (8), p.1295-1302, 1995.
60. ZELEDON, R.; BOLANOS, R.; ROJAS, M. Scanning electron microscopy of the final phase of the cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. **Acta Tropical**, v. 41, p. 39-43, 1984.

ANEXOS



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEa)



CERTIFICADO

Nº 139

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEa, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEa, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no(a) Projeto de pesquisa abaixo especificado(a), estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care).",

PROCESSO: 53376/05-08 **APROVADO:** RO-06/2005 11/10/05

TÍTULO: "CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS T₆ZFPS CONTENDO DOMÍNIO CCCH DE INTERAÇÃO COM ZINCO, NO PROTOZOÁRIO *TRIPANOSOMA CRUZI* (CHAGAS, 1909)".

AUTORES: Dorly de Freitas Buchi – responsável
Luiz Felipe Moscaleski Cavazzani - acadêmico

Colaboradores: Stênio Perdigão Fragoso e Patrícia P. Mörking
DEPARTAMENTO: Biologia Celular

Curitiba, 11 de outubro de 2005.

Profª. Ana Maria Caliman Filadelfi
Presidente do CEEa